

Κρυοσυντήρηση Ορχικού Ιστού

Σκούρος Σωτήριος, Ειδ/νος Ουρολογίας

Νικόλαος Σοφικίτης, MD, PhD, DMSci,
Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική Ιωαννίνων

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού

Πρέπει να γνωρίζουμε

- Διαφορετική βιολογική σύσταση σε σχέση με το νωπό σπέρμα ή το εναιώρημα των απομονωμένων σπερματοζωαρίων
- Τα τεμάχια περιλαμβάνουν πλήθος πρώιμων σπερματικών κύτταρων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης καθώς και κύτταρα Leydig και Sertoli (σπερματογένεση και στεροειδογένεση)

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού

Προβλήματα:

- Περιορισμοί στη μετακίνηση θερμότητας και μάζας λόγω διαμερισματοποίησης
- Ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων του ορχικού ιστού
- Στη προστασία των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων προκειμένου να διατηρηθεί η λειτουργική ακεραιότητα του ορχικού ιστού
- Δημιουργία πάγου-καταστροφή του αιματοορχικού φραγμού και της δομής των σπερματοζωαρίων

Στόχος: η λειτουργική ακεραιότητα του ιστού μετά την απόψυξη

Μέσο συντήρησης: DMSO (dimethyl sulphoxide) + test yolk

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού σε αζωοσπερμικούς άνδρες

- **Αποφρακτική :**
 - Αποτυχία ή αδυναμία αποκατάστασης βατότητας γεννητικής οδού....μόνη πηγή ο ΟΡΧΙΣ
 - Μεγάλος αριθμός σπερματοζωαρίων συγκριτικά με αναρρόφηση
 - Παρόμοια αποτελέσματα μετά από ICSI με το νωπό η κατεψυγμένο σπέρμα
- **Μη αποφρακτική αζωοσπερμία:**
 - *Μονόδρομος* η βιοψία όρχεως
 - Αύξηση των ποσοστών ανεύρεσης σπέρματος με την εφαρμογή μικροχειρουργικής τεχνικής(Micro-TESE)
 - Δυνατότητα για αρκετές προσπάθειες ICSI

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού

Ενδείξεις

- Μετά από απολίνωση σπερματικών πόρων
 - πολλές φορές μη αναστρέψιμη (αποφρακτική αζωοσπερμία)
 - καλύτερη ποιότητα σπερματοζωαρίων

Belker, A.M. and D.A. Bergamini, The feasibility of cryopreservation of sperm harvested intraoperatively during vasectomy reversals. *J Urol*, 1997. 157(4): p. 1292-4.

- Κιρσοκήλη
 - Λήψη βιοψίας ορχικού ιστού σε αζωοσπερμικούς ασθενείς κατά την επέμβαση αποκατάστασης

Υψηλότερες πιθανότητες γονιμοποίησης και κύησης συγκριτικά με σπερματοζωάρια από φυγοκέντρωση σε ίζημα σπέρματος

Sofikitis, N.V., et al., Detrimental effect of left varicocele on the reproductive capacity of the early haploid male gamete. J Urol, 1996. 156(1): p. 267-70.

Pasqualotto, F.F., et al., Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocele repair. Hum Reprod, 2003. 18(1): p. 108-12.

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού σε ογκολογικούς ενήλικες

- Αζωοσπερμικοί ή με παρουσία ανώριμων σπερματοζωαρίων
- Σε αζωοσπερμικούς ασθενείς με καρκίνο όρχεως πρέπει να γίνεται διερεύνηση του υγιούς ορχικού παρεγχύματος για ώριμα σπερματοζωάρια αλλά και για *in situ* (50% πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων)

Schrader M, Muller M, Sofikitis N, Straub B, Krause H, Miller K. "Onco-tese": testicular sperm extraction in azoospermic cancer patients before chemotherapy-new guidelines? Urology 2003; 61:421-5.

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού σε ογκολογικούς εφήβους και παιδιά

- Αδυναμία λήψης σπερματοζωαρίων με εκσπερμάτιση (αυνανισμός, vibrostimulation, electroejaculation).
Χειρουργική ανάκτηση σπέρματος και κρυοσυντήρηση για τη διαφύλαξη της μελλοντικής τους γονιμότητας.

Πρίν την κατάψυξη:

- Έλεγχος ενεργής σπερματογένεσης
 - Ανεύρεση σπερματοζωαρίων
 - τροποποιημένη διαδικασία κρυοσυντήρησης των πρόδρομων σπερματοκυττάρων.

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού σε παιδιά με χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

- Μη μωσαικό Σύνδρομο Klinefelter – προοδευτική ορχική βλάβη

Όσο νωρίτερα τόσο καλύτερο

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού Συντήρηση πρόδρομων γεννητικών κυττάρων

- 1 στους 3 ογκολογικούς ασθενείς παιδικής ή εφηβικής οι όρχεις βρίσκονται σε στάδιο προ της σπερματογένεσης

Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DC, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. Lancet 2002; 360:361-7.

Σκοπός:

- Επανεμφύτευση ορχικού ιστού (αυτόλογη μεταμόσχευση)
- Αλλομεταμόσχευση

Ο όρχις είναι ανοσολογικά προνομιούχο όργανο

Αποτελεί το καλύτερο δέκτη μεταμόσχευσης κυττάρων

- Επιβίωση των παγκρεατικών νησιδίων στους κοιλιακούς όρχις των διαβητικών αρουραίων.
- Η κρυφορχική θέση είναι πιο ο κατάλληλος τρόπος για την επιβίωση των παγκρεατικών νησιδίων
- Ξενογενής μεταμόσχευση

Πιθανοί μηχανισμοί που ευθύνονται για το ανοσολογικά προνομιακό καθεστώς του όρχεως

- Ενδοορχική τεστοστερόνη και/ή προγεστερόνη
- Στεροειδή (ανοσοκατασταλτικός παράγοντας)
- Φραγμός των κυττάρων Sertoli
- Το σύστημα Fas / FasL
- Interleukins

Ενίσχυση των ανοσολογικά ευνοούμενων συνθηκών

- Ενδοσωληναριακή χορήγηση Ιντερφερόνης- γ
- Ενδοσωληναριακή μεταφορά κυττάρων από τον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού.

Ανάπτυξη των τεχνικών μεταμόσχευσης ανδρικών γεννητικών κυττάρων

Brinster & Zimmermann (1994)	First report of syngeneic transplantation (mouse)
Brinster & Avarbock (1994)	Germ line transmission (mouse)
Jiang & Short (1995)	Syngeneic transplantation (rat)
Clouthier et al. (1996)	First report of xenogeneic transplantation (rat to mouse)
Avarbock et al. (1996)	Frozen/thawed spermatogonia into mouse
Ogawa et al., (1997)	Description of transplantation techniques
Tanaka et al., (1997)	Hamster germ cells into rat testis
Franca et al., (1998)	Germ cells control their cell cycle (rat)
Nagano et al., (1998)	Culture of mouse spermatogenic cells
Ogawa et al., (1998)	Leuprolide for recipient preparation

Ανάπτυξη των τεχνικών μεταμόσχευσης ανδρικών γεννητικών κυττάρων

<i>Sofikitis et al., (1999)</i>	First report of production of human sperm into mouse & rat testicles
<i>Ogawa et al., (1999)</i>	Hamster germ cell into mouse testes
<i>Schlatt et al., (1999)</i>	First report of germ cell transfer into a primates
<i>Dobrinski et al., (1999)</i>	Attempts for xenogeneic transplantation (rabbits and dogs into mouse)
<i>Nagano et al., (1999)</i>	Patterns and kinetics of donor spermatogenesis
<i>Shinohara et al., (1999)</i>	Surface marker on mouse stem cells
<i>Schlatt et al., (1999)</i>	Magnetic cell sorting
<i>Ohta et al., (2000)</i>	Regulation of donor spermatogonia (c-kit)
<i>Reis et al., (2000)</i>	Attempts of human to animal transplantation
<i>Sofikitis et al., (2001)</i>	Successful hamster seminiferous tubuli xenogeneic transplantation
<i>Nagano et al., (2001)</i>	Primate stem cells colonize mouse testes
<i>Honaramooz et al., (2002)</i>	Syngeneic (mouse) tissue transplantation
<i>Nagano et al., (2002)</i>	(Survival of human stem cells in mouse testes)

Germ cell transplantation: a review and progress report on ICSI from spermatozoa generated in xenogeneic testes

N.Sofikitis^{1,2,6}, A.Kaponis^{1,4}, Y.Mio³, D.Makredimas¹, D.Giannakis², Y.Yamamoto¹, N.Kanakas², H.Kawamura², J.Georgiou^{2,4}, M.Schrader², E.Lolis⁴, X.Giannakopoulos², D.Loutradis¹, V.Tarlatzis⁵ and I.Miyagawa¹

Φαίνεται ότι η αυτόλογη μεταμόσχευση κατεψυγμένων / αποψυγμένων ορχικών γεννητικών κυττάρων, σε ένα χρονικό διάστημα μετά το τέλος της χημειοθεραπείας, μπορεί να οδηγήσει στον αποικισμό σπερματογονίων του ανθρώπινου όρχι τα οποία υφίστανται μιτώσεις και μειώσεις, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή δειγμάτων σπέρματος καλής ποιότητας.

Πιθανές κλινικές εφαρμογές των τεχνικών μεταμόσχευσης των αρσενικών γεννητικών κυττάρων

- Από άνθρωπο σε ζώο μεταμόσχευση στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία
- Από άνθρωπο σε άνθρωπο μεταμόσχευση στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία
- Αυτόλογη μεταμόσχευση κατεψυγμένων / αποψυγμένων γεννητικών κύτταρων σε άνδρες με καρκίνο των όρχεων
- Διατήρηση γονιδιώματος σε ασθενείς με καρκίνο, χρησιμοποιώντας σαν παραλήπτη όρχεις ζώων
- Διατήρηση των απειλούμενων ειδών

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Μειονεκτήματα της κρυοσυντήρησης σπερματοζωαρίων

1. Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη είναι μικρότερος τουλάχιστον κατά 25% από τον αρχικό - καταστροφή της αρχιτεκτονικής του κυτταροπλάσματος του σπερματοζωαρίου-αλλοίωση της γονιμοποιητικής τους ικανότητας
2. Η κατάψυξη των σπερματοζωαρίων αφορά την κατάψυξη περιορισμένου μέρους του γενετικού συνδυασμού του ασθενούς διότι τα σπερματοζωάρια αποτελούν διαφοροποιημένα κύτταρα και συνεπώς δεν μπορούν να υποστούν μείωση ή μίτωση άρα και συγκεκριμένος αριθμός συνδυασμών των χρωματωμάτων.
3. Δεν γνωρίζουμε από ποιόν όρχη προέρχεται στο σπερματοζωάριο που συλλέγουμε. Σε ασθενείς με καρκίνο όρχεος το σπερματοζωάριο μπορεί να προήλθε γειτονικά από τον όγκο και πιθανόν να υφίσταται επιγενετικές αλλαγές λόγω παραγόντων που εκκρίνονται από τον όγκο.

Πλεονεκτήματα κρυοσυντήρησης ορχικού ιστού

1. Μετά την απόψυξη απομένει μεγάλος αριθμός σπερματοζωαρίων άρα και μεγαλύτερη δυνατότητα επιλογής του καλύτερου σπερματοζωαρίου που θα χρησιμοποιηθεί για τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
2. Κρυοσυντήρηση ενός μεγάλου αριθμού σπερματογονίων/σπερματοκυττάρων, τα οποία μετά από καλλιέργεια μπορούν να υποστούν in vitro μειωτικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα τη γένεση νέων απλοειδών κυττάρων με αποτέλεσμα ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη να είναι μεγαλύτερος απο τον αρχικό αριθμό.
3. Μπορούμε να γνωρίζουμε απο ποιόν όρχη καταψύχουμε σπερματοζωάρια

Πλεονεκτήματα κρυοσυντήρησης ορχικού ιστού

4. Επιτρέπει και κατάψυξη **πρωτογενών σπερματοκυττάρων** πριν από το δικτυωτό στάδιο της μετάφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης όπου γίνεται η ανταλλαγή γενετικού υλικού ανάμεσα στις χρωματίδες. Επομένως οι συνδυασμοί γενετικού υλικού είναι πολύ περισσότεροι για μελλοντική χρήση τους σε γονιδιακές θεραπείες.
5. Κατάψυξη και **σπερματογονίων** και μετά το τέλος της χημειοθεραπείας σε έναν ασθενή μπορεί να επιχειρηθεί επαναποικιοποίηση του όρχη με τη μεταφορά τους στο ορχικό παρέγχυμα(αυτόλογη μεταμόσχευση) όπου και θα υποστούν νέες μειώσεις άρα και παραγωγή νέων σπερματοζωαρίων από σπερματογόνια τα οποία δεν έχουν υποστεί χημειοθεραπεία.

Ευχαριστώ

